

粘虫颗粒体病毒对苏云金杆菌的增效特性及 对 Bt 毒蛋白的降解活化作用

徐 健^{1,2}, 刘 琴², 谭永安¹, 祝树德^{1,*}

(1. 扬州大学园艺与植物保护学院, 江苏扬州 225009; 2. 江苏里下河地区农科所, 江苏扬州 225007)

摘要: 以小菜蛾 *Plutella xylostella* 为试虫, 采用生物测定方法测定了粘虫颗粒体病毒 (*Pseudaletia unipuncta* granulosus virus, PuGV-Ps) 对苏云金杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, Bt) 的增效作用。结果表明: 不同配伍 PuGV-Ps 和 Bt 间的共毒系数在 105.3 至 195.0 之间, PuGV-Ps 对 Bt 毒力具有增强作用, 其中以 Bt:PuGV-Ps 为 4:1 增效作用最明显, 72 h LC_{50} 为 0.039 mg/mL。不同温度和 pH 值都影响 PuGV-Ps 对 Bt 的增效作用, 16℃ ~ 20℃ 增效程度明显高于 24℃ ~ 32℃, 而碱性条件下 (pH 8 ~ 9) 增效作用更显著。PuGV-Ps 对 Bt 的增效作用因小菜蛾龄期不同而变化, 2、3 龄幼虫死亡率较单独使用 Bt 分别提高了 50% 和 30.31%, 而作用于低龄 (1 龄) 和高龄 (4 龄) 幼虫时对 Bt 的增效作用不显著。PuGV-Ps 饲喂 2 h 后再接毒 Bt, 小菜蛾死亡率明显提高, 48 h 死亡率达 66.67%, 较直接饲喂 Bt + PuGV-Ps 处理死亡率提高了 53.87%, 差异极显著。SDS-PAGE 表明 PuGV-Ps 具有碱性蛋白酶的活性, 离体条件下能促进 δ -内毒素酶解为 47 kD, 60 kD 和 61 kD 的毒性肽。

关键词: 粘虫颗粒体病毒; 苏云金杆菌; 增效特性; Bt 毒蛋白; 小菜蛾

中图分类号: Q965 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2008)01-0026-07

Synergistic effects of *Pseudaletia unipuncta* granulosus virus (PuGV-Ps) on *Bacillus thuringiensis* (Bt) and the involved degradation of Bt toxins

XU Jian^{1,2}, LIU Qin², TAN Yong-An¹, ZHU Shu-De^{1,*} (1. College of Horticulture and Plant Protection, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009, China; 2. Agricultural Institute of Lixiahe Area, Yangzhou, Jiangsu 225007, China)

Abstract: The synergistic effects of *Pseudaletia unipuncta* granulosus virus (PuGV-Ps) on *Bacillus thuringiensis* (Bt) were tested by bio-assays employing larvae of the diamondback moth *Plutella xylostella*. The results indicated that the co-toxicity coefficients (CTC) of Bt combined with PuGV-Ps in different ratios were diverse from 105.3 to 195.0, showing a positive synergistic effect of PuGV-Ps on Bt. Among the mixtures, the most significant effect was in the 4:1 ratio of Bt and PuGV-Ps, in which the LC_{50} was 0.039 mg/mL. When environmental temperature was low (16℃ and 20℃), the synergistic effects were statistically significant, while there were no differences under temperatures of 28℃ and 32℃ compared with the treatment of feeding the insects with Bt alone. pH value influenced the synergistic effect gravely, which was elevated along with increase of pH value. In higher pH value of 8 and 9, PuGV-Ps elevated mortalities of *P. xylostella* larvae by Bt up to 16.67% and 23.33%, respectively. The co-effects of Bt and PuGV-Ps were also varied along with the larval age. Mortalities of the 2nd and 3rd instar larvae increased by 50% and 30.31%, respectively, in the treatment of Bt + PuGV-Ps compared with that of Bt only, but no significant synergistic effects were found in tests with the 1st and 4th instar larvae. Much higher synergistic effect was observed in treatments with oral inoculation of PuGV-Ps 2 h prior to Bt treatment, and the mortality 48 h after treatment increased 66.67%

基金项目: 国家重点实验室开放课题 (Chinese IPM0703); 国家科技支撑计划 (2006BAD02A03); 江苏省自然科学基金项目 (BK 2006067); 江苏省科技攻关项目 (BE 2005612); 江苏省研究生培养创新工程项目 (CX07B-1902)

作者简介: 徐健, 男, 1968 年生, 扬州人, 博士研究生, 研究方向为微生物农药的研究和应用, E-mail: bio-xj@163.com

* 通讯作者 Author for correspondence, Tel.: 0514-7978110; E-mail: zsdinsect@yahoo.com.cn

收稿日期 Received: 2007-07-11; 接受日期 Accepted: 2007-09-24

compared with the treatment of oral inoculation with Bt and PuGV-Ps simultaneously. SDS-PAGE analysis showed that *in vitro* the δ -endotoxin with molecular weight about 130 kD could be degraded by PuGV-Ps into 47 kD, 60 kD and 61 kD activated toxins that resisted further degradation.

Key words: *Pseudaletia unipuncta* granulosis virus; *Bacillus thuringiensis*; synergistic effect; Bt toxin; *Plutella xylostella*

苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)是一种分布广泛的革兰氏阳性土壤细菌,在形成芽孢的同时会在菌体的一端或两端形成伴孢晶体,称为杀虫晶体蛋白(insecticidal crystal proteins, ICPs)或 δ -内毒素(δ -endotoxin)。伴孢晶体被敏感昆虫幼虫吞食后,在肠道碱性环境和蛋白酶作用下释放出的毒性肽与昆虫中肠上皮细胞的特异受体结合形成离子通道,破坏细胞渗透平衡,使细胞肿胀破裂,最终导致昆虫死亡(Schenpf *et al.*, 1998)。由于 ICPs 对鳞翅目、鞘翅目、双翅目和膜翅目等多种重要的农林业害虫具毒杀作用,Bt 已作为有效的微生物农药广泛应用于害虫的生物防治(喻子牛, 1990)。然而受本身生物学特性的限制,在实际使用中存在毒力不强、杀虫谱窄、杀虫速度慢等影响大面积推广应用的问题。人们试图从菌株筛选、遗传改良、剂型加工、增效因子研究等途径来提高 Bt 的活性(曹琼, 2004)。Tanada(1959)发现美洲粘虫颗粒体病毒(*Pseudaletia unipuncta* granulosis virus, PuGV)与其核型多角体病毒(nuclear polyhedrosis virus, PuNPV)共同感染虫体时, PuGV 能显著提高核型多角体病毒对粘虫的感染率和致死率,后来证明在其中起增效作用的因子是 PuGV 包涵体中的一种分子量为 100 kD 左右的蛋白。丁翠等(1995)将此病毒以东方粘虫 *P. separata* 为宿主感染增殖,获得转宿主粘虫颗粒体病毒(简称 PuGV-Ps),可以提高棉铃虫核型多角体病毒(*Helicoverpa armigera* NPV, HaNPV)、东方粘虫核型多角体病毒(*PsNPV*)等对宿主的感染力。徐健等(2003)的实验证明, PuGV-Ps 对苏云金杆菌的毒力也具有增强作用。其他颗粒体病毒对 Bt 的增效作用也有文献报道,如将纯化的粉纹夜蛾颗粒体病毒(*Trichoplusia ni* GV, TnGV)增效蛋白加入 Bt 中,可以提高 Bt 对 6 种鳞翅目幼虫的致死效果,害虫的死亡率提高了 2~10 倍(Granados *et al.*, 2001); Bt 与菜青虫颗粒体病毒(*Pieris rapae* GV, PrGV)混剂对菜青虫的共毒系数达 161.91(邬开朗等, 2000);体外表达的棉铃虫颗粒体病毒(HaGV)重组增效蛋白可对 Bt 增效 20.7%~35.4%(刘相国等, 2001)。

小菜蛾 *Plutella xylostella* 是世界性蔬菜害虫,其

发生范围广、危害严重,不仅对大量的化学杀虫剂产生了严重的抗药性,而且也是第一个被发现对 Bt 产生抗性的害虫(Tabashnik *et al.*, 1994),但利用 Bt 对其进行生物防治是综合治理的重要手段。本实验以小菜蛾为试虫,研究 PuGV-Ps 对 Bt 的增效特性和机理,从理论上探讨颗粒体病毒的增效机理,从实际应用上寻找提高 Bt 防治效果的途径,为开发高效实用的 Bt 生防制剂奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

苏云金杆菌(Bt):江苏里下河地区农科所保存的菌种(血清型 H3a3b)。先在蛋白冻牛肉膏培养基斜面活化 24 h,移入 LB 液体培养基中,在 220 r/min 摇床上 30℃ 培养形成芽孢和晶体。用蒸馏水洗涤离心(13 000 r/min),收集沉淀,冷冻干燥制得苏云金杆菌芽孢晶体制剂。参照王瑛等(1980)方法,将芽孢和晶体混合物用蒸馏水重新悬浮,用搅拌器反复搅拌打泡,去除絮状凝集的泡沫,直至不产生泡沫为止。将去除泡沫的悬浮液经无水硫酸钠-四氯化碳双相分离,取上清液离心(13 200 r/min),沉淀用蒸馏水离心洗涤 3 次后,冷冻干燥,制得纯化的 δ -内毒素,镜检纯度达 99.36%,置 -20℃ 备用。

粘虫颗粒体病毒(PuGV-Ps):粘虫颗粒体病毒由中国科学院动物研究所提供。参照刘强等(1998)方法,用原始病毒以 6.6×10^{10} OB/mL 的浓度口服感染人工饲料饲养的 2 龄东方粘虫幼虫,收集感病的虫尸,相差显微镜镜检确认为颗粒体病毒感染后,研磨匀浆,3 层纱布过滤,滤液经差速离心(5 000 r/min 10 min, 15 000 r/min 40 min),弃去组织残渣,用无菌的生理盐水多次洗涤沉淀,再反复差速离心,得纯化的转寄主粘虫颗粒体病毒 PuGV-Ps,用真空冷冻干燥机冷冻干燥。另用蒸馏水悬浮纯化的 PuGV-Ps,置于 80℃ 水浴 20 min 后,离心并冷冻干燥,制得灭活变性的 PuGV-Ps。

供试昆虫:小菜蛾为采自扬州郊外、实验室连续繁殖 30 代的种群。将青菜汁处理的滤纸置于产

卵箱中供羽化小菜蛾产卵,每天更换滤纸获得同日龄卵粒。用蛭石盘中发芽的油菜籽子叶饲喂孵化的小菜蛾幼虫,在 $25^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度 80%、光照 2 000 lx 的恒温昆虫饲养室内饲养,选取不同龄期的幼虫待测。

1.2 方法

1.2.1 PuGV-Ps 对 Bt 的增效作用:用蒸馏水将 Bt、PuGV-Ps 配制成一定浓度悬浮液,并按照 Bt:PuGV-Ps 为 1:1,2:1,4:1 的比例混配成不同配比的悬浮液。按照生物杀虫剂药效测定的浸液饲喂法(陈涛等,1993),根据预备实验的结果,在死亡率 10%~90% 的范围内,以等比法将上述悬浮液用蒸馏水稀释成 5~6 个浓度梯度。将预选的同叶龄的等面积青菜叶在各浓度药液中浸渍 1 min,风干后置于直径 9 cm 培养皿中,接种预饥 2 h 的 2 龄小菜蛾幼虫,每处理接虫 20 头,重复 3 次,另设蒸馏水处理作对照。将各处理置 $25^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 光照培养箱中饲养,分别于 48 h,72 h 后检查死亡率。计算致死中浓度(LC_{50})和共毒系数(CTC)。

1.2.2 不同温度、pH 下 PuGV-Ps 对 Bt 的增效作用:温度影响实验设 Bt 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 Bt 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + PuGV-Ps 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 两个药剂,16 $^{\circ}\text{C}$,20 $^{\circ}\text{C}$,24 $^{\circ}\text{C}$,28 $^{\circ}\text{C}$,32 $^{\circ}\text{C}$ 5 个温度共 10 个处理,药剂用蒸馏水稀释,另设不同温度蒸馏水处理作对照。pH 影响实验同样设 Bt 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 Bt 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + PuGV-Ps 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 两个药剂,pH 为 5.0,6.0,7.0,8.0,9.0 5 个酸碱度共 10 个处理,药液用上述 pH 值的 0.1 mol Tris-HCl 缓冲液配制,置 25 $^{\circ}\text{C}$ 的光照培养箱内,同时用不含药剂的不同 pH 的 0.1 mol Tris-HCl 缓冲液处理作对照。上述处理按照 1.2.1 节的方法接入预饥 2 h 的 2 龄小菜蛾幼虫饲养,48 h 后检查并计算校正死亡率。

1.2.3 不同龄期试虫 PuGV-Ps 对 Bt 的增效作用:用蒸馏水分别配制 Bt 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$,50 $\mu\text{g}/\text{mL}$,100 $\mu\text{g}/\text{mL}$,200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 4 个浓度及 Bt 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + PuGV-Ps 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$,Bt 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + PuGV-Ps 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$,Bt 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + PuGV-Ps 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$,Bt 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + PuGV-Ps 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 4 个浓度药液,按照 1.2.1 节方法处理叶片,根据 Bt 和 Bt + PuGV-Ps 药液浓度由低到高,依次接入预饥 2 h 的 1 龄、2 龄、3 龄、4 龄的小菜蛾幼虫,同时设蒸馏水处理作对照,25 $^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 光照培养箱中培养,48 h 后检查并计算校正死亡率。

1.2.4 试虫提前不同时间取食 PuGV-Ps 对 Bt 毒力的影响:将同叶龄的青菜叶片分别在 PuGV-Ps 12.5

$\mu\text{g}/\text{mL}$, Bt 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 PuGV-Ps 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + Bt 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的稀释液中浸渍 1 min 后取出风干,接种预饥 2 h 的 2 龄小菜蛾幼虫。取食 PuGV-Ps 叶片的小菜蛾待取食 1 h,2 h,3 h 后,换以 Bt 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 处理的叶片饲喂,另设蒸馏水处理作对照。每处理接虫 20 头,重复 3 次,25 $^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 光照培养箱中培养,于小菜蛾取食 Bt 24 h,48 h,72 h 后检查并计算校正死亡率。

1.2.5 离体条件下 PuGV-Ps 对 Bt 内毒素的酶解活化作用:用蒸馏水将 δ -内毒素、PuGV-Ps 和灭活 PuGV-Ps 配制成相同浓度悬浮液,并按照 δ -内毒素:PuGV-Ps 或灭活 PuGV-Ps 1:1 的比例混合,另以等量的 δ -内毒素、PuGV-Ps 和灭活 PuGV-Ps 悬浮液为对照。将上述处理以 13 000 r/min 离心,去上清,加入 0.1 mol Na_2CO_3 (pH 10.7) 碱解液使其完全溶解。25 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h 后加入等量 1 \times 上样缓冲液,100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 5 min,12 000 r/min 离心,取上清液用 SDS-PAGE 检测蛋白。

2 结果与分析

2.1 PuGV-Ps 对 Bt 的增效作用

以小菜蛾 2 龄幼虫测定 PuGV-Ps 对 Bt 的增效作用,结果列于表 1。结果显示,Bt 对小菜蛾具有较高的毒力,48 h 和 72 h 的 LC_{50} 分别为 0.038 mg/mL 和 0.013 mg/mL。PuGV-Ps 处理 48 h 和 72 h 的 LC_{50} 分别为 526.01 mg/mL 和 300.49 mg/mL,对小菜蛾基本没有毒杀作用,因此在本实验中作为增效剂进行药效评价。Bt 与 PuGV-Ps 的不同配比中,除 1:1 配比 48 h 共毒系数为 105.3 外,其余组合共毒系数均显著大于 120,按照 Sun 和 Johnson(1960)杀虫剂联合作用评价标准衡量,其表现为增效作用。不同组合以 Bt:PuGV-Ps (4:1) 增效作用最显著,48 h 共毒系数为 154.6,72 h 共毒系数高达 195.0。

2.2 不同温度、pH 下 PuGV-Ps 对 Bt 的增效作用

不同温度影响实验结果显示,16 $^{\circ}\text{C}$ 和 20 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,PuGV-Ps + Bt 的毒力显著高于 Bt 的毒力,48 h 小菜蛾校正死亡率分别为 23.33% 和 36.67%,较单用 Bt 分别提高了 102.9% 和 57.18%,差异达显著水平。随温度升高,Bt 对小菜蛾的作用效果也逐步提高,而 PuGV-Ps 对 Bt 的增效幅度相对减小,32 $^{\circ}\text{C}$ 时 PuGV-Ps + Bt 处理的小菜蛾校正死亡率为 90%,较单用 Bt 86.67% 的死亡率差异不显著(图 1:A)。不同 pH 对 Bt 的毒力影响不大,但显著影响 PuGV-Ps

表 1 粘虫颗粒体病毒与苏云金杆菌对小菜蛾的增效作用

Table 1 Effect of PuGV-Ps on the virulence of <i>Bacillus thuringiensis</i> to <i>Plutella xylostella</i>				
处理 Treatment	时间 Time (h)	毒力回归方程 Regress equation	致死中浓度 (95% 置信区间) LC ₅₀ (mg/mL) (95% credible limit)	共毒系数 CTC
Bt	48	$Y = 7.27 + 1.60X$	0.038 (0.024 - 0.066)	—
	72	$Y = 7.92 + 1.55X$	0.013 (0.007 - 0.022)	—
PuGV-Ps	48	$Y = 2.18 + 0.86X$	526.01 (191.25 - 47369.49)	—
	72	$Y = 2.65 + 0.84X$	300.49 (139.68 - 2097.79)	—
Bt : PuGV-Ps (1 : 1)	48	$Y = 5.35 + 0.89X$	0.40 (0.27 - 0.82)	105.3
	72	$Y = 6.28 + 1.25X$	0.094 (0.039 - 0.210)	159.9
Bt : PuGV-Ps (2 : 1)	48	$Y = 6.61 + 2.02X$	0.16 (0.090 - 0.310)	133.8
	72	$Y = 8.15 + 2.53X$	0.057 (0.033 - 0.087)	130.8
Bt : PuGV-Ps (4 : 1)	48	$Y = 6.15 + 1.35X$	0.14 (0.10 - 0.20)	154.6
	72	$Y = 7.49 + 1.77X$	0.039 (0.029 - 0.049)	195.0

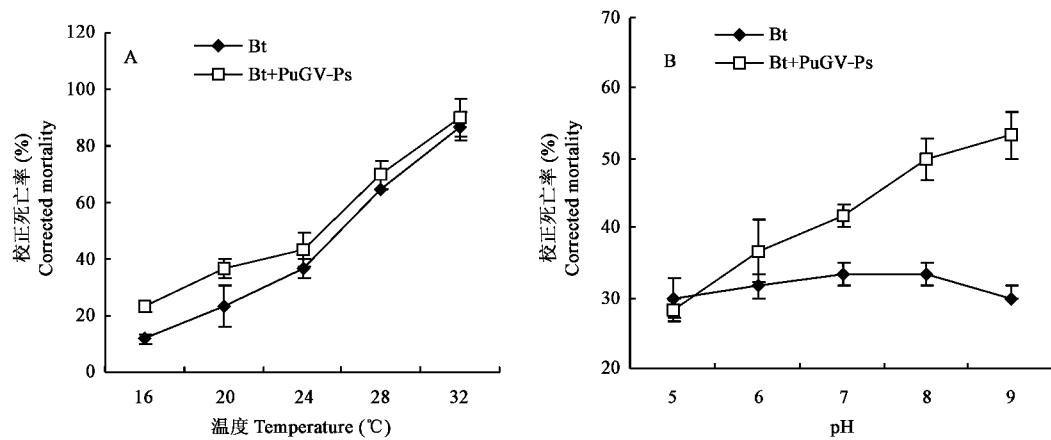


图 1 不同温度 (A) 和 pH (B) 下 PuGV-Ps 对 Bt 作用小菜蛾 2 龄幼虫毒力的影响
Fig. 1 Effect of PuGV-Ps on virulence of Bt under different temperatures (A) and pH (B)
to the 2nd instar larvae of *Plutella xylostella*

对 Bt 的增效作用。酸性条件下 (pH 5.0 和 pH 6.0) 增效作用不明显 , 较 Bt 处理差异不显著。碱性条件下 (pH 8.0 和 pH 9.0) , PuGV-Ps 显著提高了 Bt 对小菜蛾的毒力 , pH 9.0 时 PuGV-Ps + Bt 处理小菜蛾校正死亡率达 53.33% , 而同样 pH 下的 Bt 处理小菜蛾死亡率仅为 30% (图 1 : B)。

2.3 小菜蛾不同龄期 PuGV-Ps 对 Bt 的增效作用
PuGV-Ps 对 Bt 的毒力影响随小菜蛾龄期的不同而有所变化 (图 2)。在实验的 4 个龄期幼虫中 , PuGV-Ps + Bt 对 2 龄和 3 龄的毒力较高 , 校正死亡率分别为 45% 和 71.67% , 较同浓度单用 Bt 处理的校正死亡率提高了 50% 和 30.31% , 差异显著。低龄 (1 龄) 和高龄 (4 龄) 的小菜蛾对 PuGV-Ps + Bt 的增效作用反应不敏感 , 与单用 Bt 的毒力无显著差异。

2.4 小菜蛾取食 PuGV-Ps 时间对 Bt 毒力的影响
1 龄小菜蛾先以 PuGV-Ps 处理的叶片饲喂 1 h , 2 h , 3 h 后 , 再饲喂 Bt 处理的叶片 , 同样可以提高小

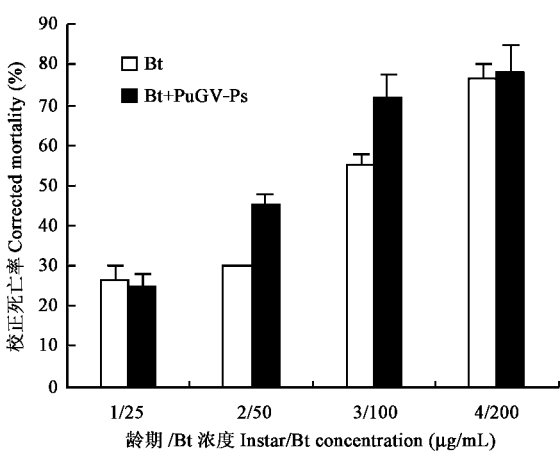


图 2 小菜蛾不同龄期 PuGV-Ps 对 Bt 毒力的影响
Fig. 2 Effect of PuGV-Ps on virulence of Bt in different instars of *Plutella xylostella*

菜蛾死亡率 (图 3)。与直接饲喂 Bt + PuGV-Ps 处理相比 , 在饲喂 PuGV-Ps 2 h , 3 h 后再接种 Bt , 能显著提高小菜蛾的死亡率 , 其中以饲喂 PuGV-Ps 2 h 后接

毒 Bt 的增效作用最为明显 48 h 和 72 h 校正死亡率分别达 66.67% 和 90% ,较直接用 Bt + PuGV-Ps 处理 校正死亡率分别提高了 53.87% 和 34.99% ,差异显著。饲喂 PuGV-Ps 1 h 后接毒 Bt ,小菜蛾死亡率较 Bt + PuGV-Ps 处理没有明显提高 ,差异不显著(图 3)。

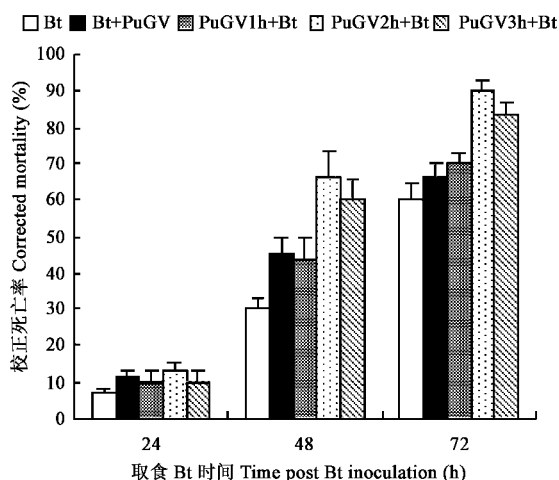


图 3 1 龄小菜蛾提前不同时间取食 PuGV-Ps 对 Bt 毒力的影响

Fig. 3 Effect on virulence of Bt of inoculating PuGV-Ps at different time prior to Bt application in the 1st instar larvae of *Plutella xylostella*

2.5 离体条件下 PuGV-Ps 对 δ -内毒素的酶解活化作用

在 pH 10.7 的碱性条件下, δ -内毒素溶解为 130 kD 为主的蛋白带,少量 δ -内毒素降解成分子量在 60 ~ 130 kD 范围内的毒性肽。PuGV-Ps 包涵体在碱性条件下解离出分子量为 108 kD 的增效蛋白和 34 kD 颗粒体蛋白为主的蛋白带。灭活变性的 PuGV-Ps 中也解离出 108 kD 的增效蛋白,34 kD 的病毒粒子蛋白明显高于 PuGV-Ps 中的含量。晶体蛋白和 PuGV-Ps 共同孵育 1 h 后,130 kD 的 δ -内毒素几乎被完全酶解为 61 kD,60 kD 和 47 kD 的毒性肽。灭活变性的 PuGV-Ps 对 δ -内毒素没有明显酶解活化作用(图 4)。

3 讨论

粘虫颗粒体病毒(PuGV)是发现最早的具有增效作用的颗粒体病毒,其起增效作用的主要成分是颗粒体病毒包涵体中的一种分子量为 100 kD 左右的蛋白。目前已在 9 种颗粒体病毒、4 种痘病毒、1 种核型多角体病毒中发现了增效蛋白的存在(徐健

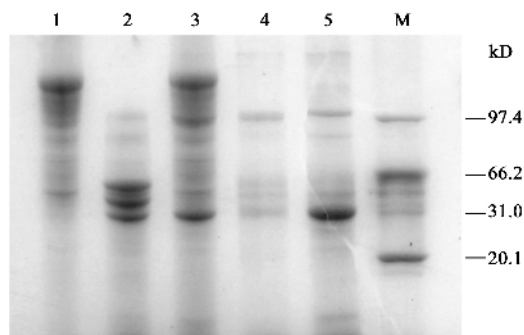


图 4 离体条件下 PuGV-Ps 对 δ -内毒素的酶解活化作用

Fig. 4 Effect on the degradation of δ -endotoxin by PuGV-Ps *in vitro*

1: δ -内毒素 δ -endotoxin; 2: δ -内毒素 + PuGV-Ps δ -endotoxin + PuGV-Ps; 3: δ -内毒素 + 加热变性 PuGV-Ps δ -endotoxin + heat-denatured PuGV-Ps; 4: PuGV-Ps; 5: 加热变性 PuGV-Ps Heat-denatured PuGV-Ps; M: 标准蛋白 Standard protein marker.

等 2005)。关于增效蛋白的增效机理,目前有两种观点:一种认为增效蛋白是一种金属蛋白酶,进入虫体后可以降解昆虫中肠的围食膜(peritrophic matrix, PM),破坏中肠粘膜的物理屏障,使病毒粒子(或 Bt)更容易同中肠柱状细胞接触,相对增加了病毒(或 Bt)的有效感染量(Wang *et al.*, 1994; Wang and Granados, 1997);另一种是直接作用于质膜和病毒包涵体膜上的增效蛋白受体位点,促进病毒粒子与质膜的融合,增加病毒的感染力(Tanada *et al.*, 1983; Uchima *et al.*, 1989)。目前颗粒体病毒对 Bt 的增效机制的研究尚不够深入,一般认为颗粒体病毒对 Bt 的增效作用机理可能更多地表现在破坏中肠围食膜结构,增加 Bt 毒蛋白的通透能力上(Granados *et al.*, 2001)。

围食膜是昆虫中肠的特有非细胞结构,具有保护中肠上皮细胞,阻止病原物的侵染等多种功能(陆秀君等, 2003)。Yunovitz 等(1986)从海灰翅夜蛾 *Spodoptera littoralis* 中分离了中肠围食膜,离体实验证明可以限制已降解的 δ -内毒素的通透性。本实验测试了在饲毒 Bt 前 2 ~ 3 h 饲喂 PuGV-Ps,小菜蛾死亡率较直接饲喂 Bt + PuGV-Ps 明显提高,该结果支持了增效蛋白是金属蛋白酶破坏围食膜的假说,即先行进入中肠的 PuGV-Ps 作用并破坏围食膜结构,增加了对外源物质的通透性,后续进入的 Bt 将更容易突破围食膜屏障,作用于中肠柱状细胞 Bt 受体,相对于没有先行饲喂 PuGV-Ps 的处理,进入虫体 Bt 的有效量相对增加,对小菜蛾的毒杀作用也得到加强。Washburn 等(1995)报道粉纹夜蛾在蜕皮时并不形成围食膜,而是在蜕皮后 15 h 形成的。Wang 和

Granados(1998)则认为粉纹夜蛾在蜕皮前、蜕皮时及蜕皮后中肠都形成围食膜。本实验用不同龄期的小菜蛾测定 PuGV-Ps + Bt 的效果,发现 PuGV-Ps 对 Bt 的增效作用因小菜蛾的大小不同而有所差异,暗示了不同龄期小菜蛾幼虫围食膜的形成可能存在差异,这种差异表现出 PuGV-Ps + Bt 对低龄(1 龄)和高龄(4 龄)幼虫的毒力增强作用不显著。

大多数 δ -内毒素本身没有杀虫活性,只有被昆虫取食后,在中肠内溶解为原毒素,并经中肠蛋白酶水解作用,降解为 60 kD 左右的抗酶多肽活力片段即毒素,才具有杀虫活性(Tojo and Aizawa,1983; English and Slatin,1992; Ogiwara *et al.*,1992)。因此,溶解和酶解活化是 δ -内毒素产生杀虫作用的首要条件。中肠是苏云金杆菌 δ -内毒素的作用部位,晶体蛋白在昆虫中肠的迅速溶解需要碱性及还原性的环境,而毒素的活化需昆虫中肠蛋白酶的作用。本实验中,PuGV-Ps 可以使 Bt 晶体蛋白得到降解,病毒 34 kD 的包涵体蛋白也被进一步降解为小分子的多肽,而对热处理变性的 PuGV-Ps 则失去对 Bt 晶体蛋白及病毒包涵体蛋白的降解能力,说明活体的 PuGV-Ps 包涵体中含有碱性蛋白酶,这种碱性蛋白酶在碱性条件下不仅能降解包涵体蛋白,促进病毒粒子的释放,而且可以酶解活化 Bt 晶体蛋白,使 δ -内毒素降解成对昆虫具有毒性作用的毒素。同时在晶体蛋白的底物存在下,这种碱性蛋白酶更多地作用于 δ -内毒素的降解。许多杆状病毒和苏云金杆菌混用表现出增效作用,这种增效作用一定程度上可能与杆状病毒中的内源性碱性蛋白酶提高对 Bt 酶解活化作用有关。

普遍认为苏云金杆菌在施用时不能和碱性药剂同时使用。本实验则证明在一定的 pH 范围内(pH 5~9)酸碱度对 Bt 毒力影响不大,而碱性条件则更能促进 PuGV-Ps 对 Bt 毒力的提高。这一点可以从颗粒体病毒和增效蛋白的物化性质上得到证实。对 Bt 有增效作用的主要物质是 PuGV-Ps 中的增效蛋白,在碱性条件下,包裹 PuGV-Ps 粒子的包涵体蛋白溶解,不仅释放出病毒粒子,同时也释放出增效蛋白(刘强和丁翠,1999),这样可以更直接地作用于小菜蛾的中肠围食膜,也就提高了 Bt 的杀虫效果。

本实验中,低温更有利于 PuGV-Ps 发挥增强 Bt 杀虫效果的结果,具有重要的实际意义。很多情况下,温度是制约 Bt 使用范围的重要因素,Bt 的杀虫效果一般呈正温度效应,即随着环境温度的升高,其杀虫活性也随之上升(Earle *et al.*,1996; Vicent *et*

al.,2006),因而,对低温发生的害虫,Bt 的效果就不理想。比如我国北方早春普遍发生的重要林木害虫春尺蠖 *Apocheima cinerarius*,发生期的气温多数在 20℃ 以下,虽然春尺蠖本身对 Bt 比较敏感,但由于低温的原因,其实际应用效果并不理想(个人通讯)。本实验结果表明,在低温下(16℃ 和 20℃),PuGV-Ps 对 Bt 的增强作用更为明显,提示其可以作为提高低温下 Bt 药效的增强因子,用于低温发生害虫的生物防治。

参 考 文 献 (References)

- Cao Q,2004. Effects of some enhancing factors on the insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Wuhan University of Science and Engineering*,17(2):44-48. [曹琼,2004. 苏云金杆菌杀虫增效作用研究进展. 武汉科技学院学报,17(2):44-48]
- Chen T, Zhang YQ, Sun CB, Xia KX, Luo C, Gan X,1993. *Measuring Methods of Bio-Pesticides and Their Principles*. Beijing: China Agriculture Press. 208-210. [陈涛,张友清,孙传柏,夏克祥,罗成,干信,1993. 生物农药检测及其原理. 北京:农业出版社. 208-210]
- Ding C, Deng T, Cai XY,1995. Enhancement of baculovirus infection by the synergistic factor of a granulosis virus of the armyworm. *Acta Entomol. Sin.*,38(4):407-413. [丁翠,邓塔,蔡秀玉,1995. 粘虫颗粒体病毒的增效因子提高杆状病毒的感染. 昆虫学报,38(4):407-413]
- Earle SR, Gerald RS, Miguel AR,1996. Ecological factor affecting the pathogenicity of *Bacillus var. thuringiensis* to the European corn borer and fall armyworm. *J. Invertebr. Pathol.*,8(3):365-375.
- English L, Slatin SL,1992. Mode of action of delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis*: a comparison with other bacterial toxins. *Insect Biochem. Mol. Biol.*,22(1):1-7.
- Granados RR, Fu Y, Corsaro B, Hughes PR,2001. Enhancement of *Bacillus thuringiensis* toxicity to lepidopterous species with the enhancer from *Trichoplusia ni* granulovirus. *Biological Control*,20:153-159.
- Liu Q, Ding C, Cai XY,1998. Purification and biochemical characterization of synergetic factor in the capsule of a granulosis virus of the armyworm, *Pseudaletia unipuncta*. *Chinese Journal of Virology*,14(4):352-357. [刘强,丁翠,蔡秀玉,1998. 粘虫颗粒体病毒增效因子的分离纯化及其生化性质. 病毒学报,14(4):352-357]
- Liu XG, Yang G, Qiu BS, Zhang KQ, Tian B,2001. Expression of two truncated enhancing gene from *Helicoverpa armigera* granulosis virus in *E. coli* and its preliminary bioassay. *Acta Microbiologica Sinica*,41(2):167-171. [刘相国,杨恭,邱并生,张克勤,田波,2001. 棉铃虫颗粒体病毒增效蛋白基因 5' 端截短片段的表达及增效活性测定. 微生物学报,41(2):167-171]
- Liu Q, Ding C,1999. Enhancement of PsNPV infection by a granulosis virus and the synergistic factor. *Chin. J. Appl. Environ. Biol.*,6(3):300-304. [刘强,丁翠,1999. 粘虫颗粒体病毒及其增效因子对粘虫核型多角体病毒的增效作用. 应用与环境生物学报,6(3):300-304]

- Lu XY, Wang QY, Li GX, 2003. Advance of research of peritrophic matrix. *Journal of Agricultural University of Hebei*, 26: 205 – 207. [陆秀君, 王勤英, 李国勋, 2003. 昆虫围食膜的研究进展. 河北农业大学学报, 26: 205 – 207]
- Ogiwara K, Indrasith L, Asano A, Hori H, 1992. Processing of δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurtaki* HD-1 and HD-73 by gut juices of various insect larvae. *J. Invertebr. Pathol.*, 60: 121 – 126.
- Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, Zeigler DR, Dean DH, 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Review*, 62(3): 755 – 806.
- Sun YP, Johnson ER, 1960. Analysis of joint action of insecticides against house flies. *J. Econ. Entomol.*, 53: 887 – 892.
- Tabashnik BE, Finson N, Groeter FR, Moar WJ, Johnson MW, Lou K, Adang MJ, 1994. Reversal of resistance to *Bacillus thuringiensis* in *Plutella xylostella*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 4 120 – 4 124.
- Tanada Y, 1959. Synergism between two viruses of the armyworm, *Pseudaletia unipuncta* (Haworth)(Lepidoptera, Noctuidae). *Journal of Insect Pathology*, 1: 215 – 231.
- Tanada Y, Hess RT, Omi EM, Yamamoto T, 1983. Localization of a synergistic factor of a granulosis virus by its esterase activity in the larval midgut of the armyworm, *Pseudaletia unipuncta*. *Microbios*, 37: 87 – 93.
- Tojo A, Aizawa K, 1983. Dissolution and degradation of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin by gut juice protease of the silkworm *Bombyx mori*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 45(2): 576 – 580.
- Uchima K, Egerter DE, Tanada Y, 1989. Synergistic factor of a granulosis virus of the armyworm, *Pseudaletia unipuncta*: Its uptake and enhancement of virus infection in vitro. *J. Invertebr. Pathol.*, 54: 156 – 164.
- Vicent V, Jean-Louis S, Raynald L, 2006. Influence of the biophysical and biochemical environment on the kinetic of pore formation by cry toxins. *J. Invertebr. Pathol.*, 92: 160 – 165.
- Wang P, Granados RR, 1997. An intestinal mucin is the target substrate for a baculovirus enhancin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 6 977 – 6 982.
- Wang P, Granados RR, 1998. Observations on the presence of the peritrophic membrane in larval *Trichoplusia ni* and its role in limiting baculovirus infection. *J. Invertebr. Pathol.*, 72: 57 – 62.
- Wang P, Hammer DA, Granados RR, 1994. Interaction of *Trichoplusia ni* granulosis virus-encoded enhancin with the midgut epithelium and peritrophic membrane of four lepidopteran insects. *Journal of General Virology*, 75: 1 961 – 1 967.
- Wang Y, Bai C, Wen J, 1980. Study on separation of crystal and spore from *Bacillus thuringiensis*. *Acta Microbiologica Sinica*, 20(3): 285 – 288. [王瑛, 白成, 温洁, 1980. 苏云金杆菌晶体与芽孢分离的研究. 微生物学报, 20(3): 285 – 288]
- Washburn JO, Kirkpatrick BA, Volkman LE, 1995. Comparative pathogenesis of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus in larvae of *Trichoplusia ni* and *Heliothis virescens*. *Virology*, 209: 561 – 568.
- Wu KL, Hu JF, Yin YN, Hu YY, 2000. Study on synergistic action of PrGV to *Bacillus thuringiensis*. *Journal of South-Central University for Nationalities* (Nat. Sci.), 19(2): 78 – 80. [邬开朗, 胡建芳, 尹宜农, 胡远扬, 2000. 菜青虫颗粒体病毒对苏云金杆菌的增效作用. 中南民族学院学报(自然科学版), 19(2): 78 – 80]
- Xu J, Liu Q, Zhu SD, 2005. Current advances of the research on granulovirus enhancin. *Entomological Journal of East China*, 14(4): 343 – 347. [徐健, 刘琴, 祝树德, 2005. 颗粒体病毒增效蛋白研究进展. 华东昆虫学报, 14(4): 343 – 347]
- Xu J, Yin XD, Zhu JL, Qi JH, 2003. Preliminary study on the effect of PuGV to *Bacillus thuringiensis*. *Jiangsu Agricultural Sciences*, (1): 30 – 31. [徐健, 殷向东, 朱锦磊, 祁建杭, 2003. 粘虫颗粒体病毒对苏云金杆菌增效作用初探. 江苏农业科学, (1): 30 – 31]
- Yu ZN, 1990. *Bacillus thuringiensis*. Beijing: Science Press. 1 – 65. [喻子牛, 1990. 苏云金杆菌. 北京: 科学出版社. 1 – 65]
- Yunovitz H, Sneh B, Yawetz A, 1986. A new sensitive method for determining the toxicity of a highly purified fraction from δ -endotoxin produced by *Bacillus thuringiensis* var. *entomocidus* on isolated larval midgut of *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera, Noctuidae). *J. Invertebr. Pathol.*, 48: 223 – 231.

(责任编辑: 黄玲巧)